

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006831

International filing date: 31 March 2005 (31.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-107924
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 1 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 0 7 9 2 4

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
J P 2 0 0 4 - 1 0 7 9 2 4
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

出 願 人
Applicant(s): 中 尾 一 和
中外製薬株式会社

2 0 0 5 年 4 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P04-0213
【提出日】 平成16年 3月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 31/00
A61K 38/00

【発明者】
【住所又は居所】 京都府京都市西京区大枝北杵掛町 4 - 1 - 2
【氏名】 中尾 一和

【発明者】
【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内
【氏名】 北村 秀智

【特許出願人】
【識別番号】 501382317
【氏名又は名称】 中尾 一和

【特許出願人】
【識別番号】 0000003311
【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】
【識別番号】 100091096
【弁理士】
【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】
【識別番号】 100096183
【弁理士】
【氏名又は名称】 石井 貞次

【選任した代理人】
【識別番号】 100118773
【弁理士】
【氏名又は名称】 藤田 節

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 015244
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0217168

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

グアニルシクラーゼ B (GC-B) 活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、関節炎症の治療剤又は予防剤。

【請求項 2】

前記関節炎症が変形性関節症である、請求項 1 に記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 3】

前記変形性関節症が荷重関節の変形性関節症又は非荷重関節の変形性関節症である、請求項 2 に記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 4】

前記変形性関節症が変形性膝関節症である、請求項 3 に記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 5】

前記変形性関節症が変形性股関節症である、請求項 3 に記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 6】

前記変形性関節症が顎関節症である、請求項 3 に記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 7】

前記関節炎症が関節リウマチに起因する、請求項 1 に記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 8】

前記関節炎症が変形性関節症に起因する、請求項 1 に記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 9】

前記 GC-B 活性化物質が、C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) 又はその誘導体である、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 10】

前記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 及び CNP-53 から選択される、請求項 9 に記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 11】

前記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である、請求項 9 に記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 12】

前記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 ～ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである、請求項 9 に記載の治療剤又は予防剤。

【請求項 13】

GC-B 活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、関節軟骨細胞増殖促進剤。

【請求項 14】

前記 GC-B 活性化物質が、CNP 又はその誘導体である、請求項 13 に記載の増殖促進剤。

【請求項 15】

前記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 又は CNP-53 である、請求項 14 に記載の増殖促進剤。

【請求項 16】

前記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である、請求項 14 に記載の増殖促進剤。

【請求項 17】

前記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 ～ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである、請求項 14 に記載の増殖促進剤。

【請求項 18】

GC-B を活性化することによって関節炎症を抑制することを特徴とする、関節炎症の抑制方法。

【請求項 19】

前記GC-Bが、CNP又はその誘導体によって活性化される、請求項18に記載の抑制方法。

【請求項20】

前記CNPが、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来のCNP-22又はCNP-53である、請求項19に記載の抑制方法。

【請求項21】

前記CNPが、配列番号1のCNP-22又は配列番号2のCNP-53である、請求項19に記載の抑制方法。

【請求項22】

前記誘導体が、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつCNP活性を有するものである、請求項19に記載の抑制方法。

【請求項23】

GC-Bを活性化することによって関節軟骨細胞の増殖を促進することを特徴とする、関節軟骨細胞の増殖促進方法。

【請求項24】

前記GC-Bが、CNP又はその誘導体によって活性化される、請求項23に記載の増殖促進方法。

【請求項25】

前記CNPが、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来のCNP-22又はCNP-53である、請求項24に記載の増殖促進方法。

【請求項26】

前記CNPが、配列番号1のCNP-22又は配列番号2のCNP-53である、請求項24に記載の増殖促進方法。

【請求項27】

前記誘導体が、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつCNP活性を有するものである、請求項24に記載の増殖促進方法。

【請求項28】

GC-Bの活性を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む、関節軟骨細胞増殖促進剤のスクリーニング方法。

【請求項29】

GC-Bを発現する培養細胞又は関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞のGC-B活性を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む、請求項28に記載のスクリーニング方法。

【請求項30】

前記GC-B活性が、細胞内cGMP産生量として測定される、請求項28又は請求項29に記載のスクリーニング方法。

【請求項31】

GC-Bを強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を候補薬剤の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内cGMPの産生量を測定し、候補薬剤の存在下と非存在化での細胞内cGMP産生量の差を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む、請求項28～30のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

【請求項32】

GC-Bの活性を指標として、変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤のスクリーニング方法。

【請求項33】

GC-Bを発現する培養細胞又は関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞のGC-B活性を指標として変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、請求項32に記載のスクリーニング方法。

【請求項 3 4】

前記 GC-B 活性が、細胞内 c GMP 産生量として測定される、請求項 32 又は 33 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 3 5】

GC-B を強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を候補薬剤の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内 c GMP の産生量を測定し、候補薬剤の存在下と非存在化での細胞内 c GMP 産生量の差を指標として変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、請求項 32 ～ 34 のいずれか一項に記載のスクリーニング方法

【請求項 3 6】

グアニルシクラーゼ B (GC-B) 活性化物質を有効成分として含む、変形性関節症の治療剤又は予防剤。

【請求項 3 7】

グアニルシクラーゼ B (GC-B) 活性化物質を有効成分として含む、関節リウマチの治療剤又は予防剤。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 関節炎症治療剤又は予防剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、グアニルシクラーゼB（以下「GC-B」とも称する）活性化物質による関節炎症、特に変形性関節症及びその類似関節炎症、の治療剤、予防剤又は関節軟骨増殖促進剤、あるいは該関節炎症の抑制方法、関節軟骨細胞の増殖促進方法に関する。本発明はさらに、GC-Bの活性を指標とする、関節炎症治療剤又は関節軟骨細胞増殖促進剤のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

関節炎症は、関節の炎症性疾患であり、症例数の最も多い疾患が慢性関節リウマチ及び変形性関節症（骨関節症）である。

【0003】

慢性関節リウマチは、自己免疫疾患と考えられており、関節の疼痛、こわばり、腫脹の症状を伴うが、病状が進行すると、しばしば変形性関節症様の関節軟骨表面の変性に導き、ついには関節の骨や軟骨の重度の破壊が起こる。

【0004】

変形性関節症は高齢者において多発する関節軟骨の変性疾患である。変形性関節症(OA)とは、関節の構成要素の退行変性により、軟骨の破壊と骨、軟骨の増殖性変化を来す疾患であり、さらに上記変化により二次的（続発性）に関節炎（滑膜炎）を来すものである。変形性関節症は荷重関節である膝関節、肘関節および股関節にて多く認められるが[Virchows Arch 1996;260:521-663（非特許文献1）]、肩関節・肘関節・手関節のような非荷重関節においても発生が認められる。さらに顎関節においても同様の病態を示す顎関節症が知られている[J Orol fac Pain 1999;13(4):295-306（非特許文献2）]。

【0005】

変形性関節症においては、軟骨はその機能本体である軟骨基質蛋白が減じるとともに、軟骨細胞数が減少していることが知られている[Arth Rheum 2002; 46(8): 1986-1996（非特許文献3）]。しかし、軟骨には血管が分布していないこと、軟骨細胞の数が少なく高度に分化していること、軟骨前駆細胞が乏しいこと、軟骨基質の代謝回転が遅いことなどの理由から、軟骨の自己再生能力は低く変形性関節症における関節軟骨基質と軟骨細胞数の減少が自然治癒する可能性は非常に低い[Novartis Found. Symp. 2003;249:2-16（非特許文献4）]。また、変形性関節症においては、軟骨変性とともに関節炎症も同時に生じ、関節疼痛の原因となっている [J Rheumatol 2001;28(6):1330-1337（非特許文献5）]。

【0006】

慢性関節リウマチ、変形性関節症などの関節炎の治療剤・予防剤としては、例えばプロテインチロシンキナーゼインヒビター（特表平11-512708号公報（特許文献1））、N-アシル化-2-グルコサミン誘導体（特表2004-507490公報（特許文献2））、キノリン・キナゾリン系誘導体（特開平9-169646号公報（特許文献3））、などが報告されている。また、現在広く用いられている標準的な変形性関節症の治療剤は、経口で投薬される消炎鎮痛剤や、関節内に注射されるヒアルロン酸や副腎皮質ステロイドなどで、いずれも関節疼痛の抑制剤であり、関節軟骨変性に対する抑制作用を有する薬剤が求められている[Decision Base 7, 2002（非特許文献6）]。

【0007】

グアニルシクラーゼ（GC）は、GTPからセカンドメッセンジャーであるc GMPの合成を触媒する酵素ファミリーに属する膜蛋白質であり、GC-A, GC-B, …, GC-Fが知られている。GC-Bは主に血管内皮細胞に見出され、平滑筋の弛緩に関与すると考えられている。GCを活性化する物質としてナトリウム利尿ペプチド（NP）が知られている。NP類は、ANP（心房性ナトリウムペプチド）、BNP（脳性ナトリウム利尿ペプチド）およびCNP（C型ナトリウ

ム利尿ペプチド)の3種類からなり、2種類のグアニルシクラーゼ共役受容体(ANPおよびBNPに対するNPR-A、CNPに対するNPR-B)を介して、細胞内cGMP濃度を上昇させることにより、生物学的活性を示すと考えられている[Ann Rev Biochem 1991;60: 229-255(非特許文献7)]。

【0008】

グアニルシクラーゼ共役受容体でないNPR-Cは、シグナル伝達に関与しないNP類のクリアランス受容体として理解されている[Science, 1987; 238:675-678(非特許文献8)]。しかし、マウス骨髄マクロファージをリボポリサッカライド(LPS)刺激したときのシクロオキシゲナーゼ2(COX-2)誘導によるプロスタグランジンE₂(PGE₂)産生を亢進させる系において、ANPおよびCNPがNPR-Cを介した細胞内cAMP量低下作用にもとづいてANPおよびCNPがPGE₂産生抑制作用を示すことが報告されており、NPR-CのNP類のシグナル伝達への関与が示唆されている[Endocrinology 2002; 143(3):846-852(非特許文献9)]。この文献では、マウス骨髄マクロファージ(BMM)のLPS刺激によるPGE₂産生亢進に対して、ANPが最大約70%の抑制効果を示すのに対して、CNPは最大約20%の抑制効果であり、CNPの同作用が弱いことが記載されている。cAMPやcGMPなどのcyclic nucleotideを介したCOX-2の産生の制御は、細胞の種類や刺激の種類により促進/抑制と正反対の反応を取ることが知られているため、CNPによるBMM細胞でのLPS誘導のPGE₂産生抑制がその他の細胞や刺激に対して適用できるかは不明である。また、非特許文献9ではANPはマウスにLPSを投与して血中トロンボキサンB₂(TXB₂)濃度が上昇する系において抑制効果を示すことが報告されており、同じ機序のcANPでは逆に亢進させるという相反する結果が得られている。またこの文献ではANPを関節炎や敗血症などの免疫関連疾患に適応することが記載されているものの、CNPの関節疾患への適応について何ら言及していない。従ってCNPの関節炎症に対する作用については、現在まで全く知られていない。

【0009】

NP類は、体液の恒常性の制御や血圧の調節に重要な役割を果たすと報告されているが[J Clin Invest 1987;93:1911-1921(非特許文献10)、J Clin Invest 1994; 87: 1402-1412(非特許文献11)]、心臓血管系以外の様々な組織での発現とその生理活性も知られている[Endocrinol 1991;129:1104-1106(非特許文献12)、Ann Rev Biochem 1991;60: 553-575(非特許文献13)]。軟骨に関しては、BNP[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998; 95:2337-2342(非特許文献14)]またはCNPの過剰発現トランスジェニックマウスにおける成長軟骨の伸長と軟骨無形成症の治療へのCNPの使用が報告されている[Nat Med 2004;10(1):80-86(非特許文献15)、特開2003-113116公報(特許文献4)]。しかし、成長軟骨は石灰化を経て骨に置換されて最終的に消失する一時性軟骨であり、関節軟骨や気管軟骨のように、生涯にわたり存在する永久軟骨とは異なる生物学的性質を有することが知られている[Dev Biol 1989;136(2):500-507(非特許文献16)、J Cell Biol 2001;153(1):87-100(非特許文献17)]。さらに、永久軟骨である関節軟骨細胞に対するCNPの肥大化促進作用がin vitroで報告されているが[J Biol Chem 2003;278(21):18824-18832(非特許文献18)]、正常動物の関節軟骨に対するin vivoでの作用や変形性関節症における関節軟骨の変性破壊に対する作用や同疾患における関節炎症に対する作用については現在まで知られていない。

【0010】

変形性関節症においては、関節軟骨は病態のごく初期にいったん肥大化して軟骨組織容量が増加するものの[J Rheum 1991;18(3):1905-1915(非特許文献19)]、病態の進展とともに軟骨基質の変性・破壊が進行して容量は減少する[Arthritis Rheum 2004; 50(2):476-487(非特許文献20)]。このとき、関節軟骨細胞の数はアポトーシスにより減少している[Arthritis Rheum 2004; 50(2):507-515(非特許文献21)]。一方、残存している個々の関節軟骨細胞はX型コラーゲンを発現して肥大軟骨細胞に分化し、一時性軟骨の性質をもつことが知られている[Arthritis Rheum 1992;35(7):806-811(非特許文献22)]。また、関節軟骨の破壊に伴い関節炎症も生じており、臨床的に罹患関節における疼痛の要因であると考えられている[J Rheumatol. 2001;28(6):1330-1337(非特許文献5)]。変形性

関節症におけるこれらの変化の抑制、すなわち関節軟骨基質および関節軟骨細胞数の減少抑制又は復元、および関節炎抑制は、治療薬開発において有用であると考えられる。

【0011】

【特許文献1】 特表平11-512708号公報

【特許文献2】 特表2004-507490公報

【特許文献3】 特開平9-169646号公報

【特許文献4】 特開2003-113116公報

【非特許文献1】 Virchows Arch 1996;260:521-663

【非特許文献2】 J Orofac Pain 1999;13(4):295-306

【非特許文献3】 Arth Rheum 2002; 46(8): 1986-1996

【非特許文献4】 Novartis Found. Symp. 2003;249: 2-16

【非特許文献5】 J Rheumatol 2001;28(6):1330-1337

【非特許文献6】 Decision Base 7, 2002

【非特許文献7】 Ann Rev Biochem 1991;60: 229-255

【非特許文献8】 Science, 1987; 238:675-678

【非特許文献9】 Endocrinology 2002; 143(3):846-852

【非特許文献10】 J Clin Invest 1987;93:1911-1921

【非特許文献11】 J Clin Invest 1994; 87: 1402-1412

【非特許文献12】 Endocrinol 1991;129:1104-1106

【非特許文献13】 Ann Rev Biochem 1991;60: 553-575

【非特許文献14】 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998;95:2337-2342

【非特許文献15】 Nat Med 2004;10(1):80-86

【非特許文献16】 Dev Biol 1989;136(2):500-507

【非特許文献17】 J Cell Biol 2001;153(1):87-100

【非特許文献18】 J Biol Chem 2003;278(21):18824-18832

【非特許文献19】 J Rheum 1991;18(3):1905-1915

【非特許文献20】 Arthritis Rheum 2004; 50(2):476-487

【非特許文献21】 Arthritis Rheum 2004; 50(2):507-515

【非特許文献22】 Arthritis Rheum 1992;35(7):806-811

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の目的は、変形性関節症を含む関節炎症に対する新しい治療剤又は予防剤、あるいは該関節炎症の治療方法、を提供することである。

本発明の別の目的は、関節軟骨細胞の増殖を促進する薬剤又は方法を提供することである。

本発明の別の目的は、変形性関節症を含む関節炎症を抑制する方法を提供することである。

本発明の別の目的は、関節炎症治療剤のスクリーニング方法を提供することである。

本発明の別の目的は、関節軟骨細胞増殖促進剤のスクリーニング方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、グアニルシクラーゼB（GC-B）活性化物質の一種であるC型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）を過剰発現するCNPトランスジェニックマウスを作製し、関節軟骨への影響を検証した結果、CNPトランスジェニックマウスでは、関節軟骨の厚さおよび関節軟骨細胞数が有意に増加していること、さらにCNPトランスジェニックマウスを用いて作製した変形性関節症モデルでは関節腫脹に抵抗性であることおよび関節軟骨変性が抑制されること、滑膜細胞増勢、肉芽組織形成、炎症性細胞浸潤の変化が著しく弱いこと、関節軟骨中のプロテオグリカン含量は低下しなかったこと、これに対し、正常マウスを用いた変

形性関節症モデルでは、滑膜細胞増殖、肉芽組織形成、炎症性細胞浸潤の変化が顕著であったことを見出した。これらの知見から、本発明者らは、GC-B活性化物質が関節炎抑制作用と関節軟骨に対する同化的作用の両者を併せもつことを見出した。

【0014】

したがって、本発明は、以下の発明からなる。

本発明は、第1の態様において、グアニルシクラーゼB (GC-B) 活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、関節炎症の治療剤又は予防剤を提供する。

【0015】

本発明の一の実施態様において、上記関節炎症が変形性関節症である。

本発明の別の実施態様において、上記変形性関節症が荷重関節の変形性関節症又は非荷重関節の変形性関節症である。

【0016】

本発明の別の実施態様において、上記変形性関節症が変形性膝関節症である。

本発明の別の実施態様において、上記変形性関節症が変形性股関節症である。

本発明の別の実施態様において、上記変形性関節症が顎関節症である。

本発明の別の実施態様において、上記関節炎症が関節リウマチに起因するものである。

【0017】

本発明の別の実施態様において、上記関節炎症が変形性関節症に起因するものである。

本発明の別の実施態様において、上記GC-Bを活性化する物質が、C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) 又はその誘導体である。

【0018】

本発明の別の実施態様において、上記CNPが、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来のCNP-22及びCNP-53から選択されるものである。

本発明の別の実施態様において、上記CNPが、配列番号1のCNP-22又は配列番号2のCNP-53である。

【0019】

本発明の別の実施態様において、上記誘導体が、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつCNP活性を有するものである。

【0020】

本発明はさらに、第2の態様において、GC-B活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、関節軟骨細胞増殖促進剤を提供する。

【0021】

本発明の一の実施態様において、上記GC-Bが、CNP又はその誘導体である。

本発明の別の実施態様において、上記CNPが、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来のCNP-22又はCNP-53である。

【0022】

本発明の別の実施態様において、上記CNPが、配列番号1のCNP-22又は配列番号2のCNP-53である。

本発明の別の実施態様において、上記誘導体が、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつCNP活性を有するものである。

【0023】

本発明はさらに、第3の態様において、GC-Bを活性化することによって関節炎症を抑制することを特徴とする、関節炎症の抑制方法を提供する。

【0024】

本発明の一の実施態様において、上記GC-Bは、CNP又はその誘導体によって活性化される。

本発明の別の実施態様において、上記CNPが、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来のCNP-22又はCNP-53である。

【0025】

本発明の別の実施態様において、上記CNPが、配列番号1のCNP-22又は配列番号2のCNP-53である。

【0026】

本発明の別の実施態様において、上記誘導体が、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつCNP活性を有するものである。

【0027】

本発明はさらに、第4の態様において、GC-Bを活性化することによって関節軟骨細胞の増殖を促進することを特徴とする、関節軟骨細胞の増殖促進方法を提供する。

【0028】

本発明の一の実施態様において、上記GC-Bは、CNP又はその誘導体によって活性化される。

本発明の別の実施態様において、上記CNPが、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来のCNP-22又はCNP-53である。

【0029】

本発明の別の実施態様において、上記CNPが、配列番号1のCNP-22又は配列番号2のCNP-53である。

本発明の別の実施態様において、上記誘導体が、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつCNP活性を有するものである。

【0030】

本発明はさらに、第5の態様において、GC-Bの活性を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む、関節軟骨細胞増殖促進剤のスクリーニング方法を提供する。

【0031】

本発明の一の実施態様において、GC-Bを発現する培養細胞又は関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞のGC-B活性を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む。

本発明の別の実施態様において、上記GC-Bの活性が、細胞内cGMP産生量として測定される。

【0032】

本発明の別の実施態様において、上記方法は、GC-Bを強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を候補薬剤の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内cGMPの産生量を測定し、候補薬剤の存在下と非存在化での細胞内cGMP産生量の差を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む。

【0033】

本発明はさらに、第6の態様において、GC-Bの活性を指標として、変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤のスクリーニング方法を提供する。

【0034】

本発明の一の実施態様において、GC-Bを発現する培養細胞又は関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞のGC-B活性を指標として変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む。

本発明の別の実施態様において、前記GC-Bの活性が、細胞内cGMP産生量として測定される。

【0035】

本発明の別の実施態様において、上記方法は、GC-Bを強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を候補薬剤の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内cGMPの産生量を測定し、候補薬剤の存在下と非存在化での細胞内cGMP産生量の差を指標として変形

性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む。

【0036】

本発明はさらに、第7の態様において、GC-B活性化物質を有効成分として含む、変形性関節症の治療剤又は予防剤を提供する。

本発明はさらに、第8の態様において、GC-B活性化物質を有効成分として含む、関節リウマチの治療剤又は予防剤を提供する。

【発明の効果】

【0037】

本発明の、GC-B活性化物質を有効成分として含む治療剤又は予防剤は、関節軟骨の厚さおよび関節軟骨細胞数が有意に増加させること、関節腫脹に抵抗性であること、関節軟骨変性が抑制されること、滑膜細胞増勢、肉芽組織形成、炎症性細胞浸潤の変化が著しく弱いこと、並びに、関節軟骨中のプロテオグリカン含量が低下しないことなどの効果をもつことから、変形性膝関節症、変形性股関節症、変形性肘関節症、変形性脊椎症、顎関節症などの変形性関節症を含む関節炎症の治療又は予防のために有用である。本発明の医薬の投与によって、関節患部における関節軟骨基質および軟骨細胞数の減少抑制又は再生が起こり、関節軟骨変性と関節部の腫脹が抑制され、これによって関節炎症が抑制又は軽減される。特に本発明の変形性関節症治療剤は、従来の関節鏡視下手術、人工関節置換や骨切り術などの整形外科手術と比べて患者の負担や苦痛が少ないために、患者のQOLに配慮した、優れた治療剤となりうる。

【0038】

GC-B活性化物質が上記のような効果をもつという新規の知見から、GC-Bを活性化することによって、関節炎症を抑制すること及び関節軟骨細胞の増殖を促進させることが可能である。また、GC-Bの活性(たとえば細胞内cGMP産生量)を指標とすることによって、関節軟骨細胞増殖促進剤や関節炎症治療剤をスクリーニングすることも可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0039】

図面を参照しながら、本発明をさらに具体的に説明する。

本発明者らが後述の実施例2に記載のように作製したCNP-トランスジェニックマウス(CNPTgm)についてサザンブロット法を用いて遺伝子型解析を行ったところ、図3に示されるように、野生型マウスでは3本のシグナル(wild CNP gene)が検出され、CNPTgmではwild CNP geneに加えて、導入遺伝子由来の2本のシグナル(transgene)が検出された。CNPTgmでのCNPの発現を検討するため、導入した遺伝子の高発現が予想される臓器である肝臓および血漿でのCNPの濃度を調べたところ、CNP Tgmは野生型に対し、肝臓で約10倍、血漿で約24倍のCNP濃度を示しており、統計学的に有意にCNPペプチドが過剰発現されていることが確認された(実施例4の表1)。

【0040】

さらにCNPTgmの関節軟骨の組織学的解析を行うために、関節軟骨の厚さおよび軟骨細胞数を組織学的に調べたところ、関節軟骨の厚さは、CNPTgmにおいて統計学的に有意に厚いこと(図4)、また関節軟骨細胞数もCNPTgmにおいて統計学的に有意に多いこと(図5)が確認された。これらの結果から、CNPなどのGC-B活性化物質は軟骨細胞数を増加させることによって関節軟骨の厚さを増加させることが示された。

【0041】

後述の実施例6では、マウスを用いて膝関節内へのコラゲナーゼ注射により膝関節の靱帯および半月板を不安定化させて変形性関節症を惹起する変形性関節炎病態モデル動物を作製した(Am. J. Pathol. 1989;135:1001-14)。CNPTgmの関節炎症および関節軟骨変性に対する抵抗性を評価する目的で、CNPTgmおよび正常マウスを用いて作製した各変形性関節炎モデル動物を用いて検討を行ったところ、CNPTgmを用いて作製したモデル動物では、正常マウスを用いて作製したモデル動物と比べて、膝関節腫脹が有意に小さかったこと、関節軟骨変性が有意に抑制されていたこと、滑膜における滑膜細胞増勢、肉芽組織形成、炎

症性細胞浸潤の変化が著しく弱かったこと、および関節軟骨中のプロテオグリカン含量にはほとんど変化はなかったことが確認された(図6～図8)。これらの結果から、GC-B活性化物質が、変形性関節症において関節炎症抑制作用と関節軟骨変性抑制作用を有することが判明した。

【0042】

さらにまた、オスモティックポンプを移植した正常マウスを用いて、変形性関節炎モデルを作製し、インフュージョン投与したCNPの変形性関節炎モデルに対する治療効果の検討を行った。CNP投与群では膝関節腫脹に抵抗性であること、関節軟骨変性が有意に抑制されていたこと、滑膜における滑膜細胞増勢、肉芽組織形成、炎症性細胞浸潤の変化が著しく弱かったことが確認された(図9)。これらの結果から、GC-B活性化物質は変形性関節症に対する治療効果を有することが判明した。

【0043】

さらに、オスモティックポンプを移植した正常マウスの右膝関節に対して前十字靱帯切断、内側側副靱帯切断および内側半月板全切除の外科処置を施し、変形性関節症を惹起し、インフュージョン投与したCNPの変形性関節炎モデルに対する治療効果の検討を行った。その結果、CNP投与群のAUC(曲線下面積)はいずれの用量とも溶媒対照群に対し有意に小さかったことが確認された(図10)。この結果から、GC-B活性化物質が外科処置により惹起される、膝関節への物理的過荷重にもとづく変形性関節症における関節炎症に対しても抑制作用を有することが明らかになった。

【0044】

このような実証例に基づき、本発明者らは、特定の理論や特定の実験例に拘束されることなく、CNPなどのGC-B活性化物質が関節炎症抑制作用と関節軟骨に対する同化的作用の両者を併せもつことを見出した。

【0045】

したがって、本発明は、GC-B活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、関節炎症の治療剤又は予防剤を提供する。

【0046】

本発明において治療又は予防可能な関節炎症は、特に関節軟骨に関わる疾患であり、例えば、変形性関節症に起因する関節炎症、滑膜炎、関節リウマチ(例えば慢性関節リウマチ(成人)や若年性関節リウマチ(子供))、骨関節炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、痛風、強皮症、乾癬(乾癬性関節炎)、プラストミセス症などの真菌感染、強直性脊髄炎、ライター症候群、敗血症性関節炎、成人スティル病、第三次ライム病(後期)、結核(結核性関節炎)、ウイルス感染(ウイルス性関節炎)、淋疾(淋菌性関節炎)もしくはバクテリアによる感染(非りん菌性細菌性関節炎)などに起因する関節炎症が含まれるが、これらに限定されない。

【0047】

本発明の実施態様において、好ましい関節炎症は変形性関節症、あるいは、変形性関節症に起因する関節炎症である。

【0048】

変形性関節症は、関節軟骨の変性と破壊に起因する疾患であり、適応可能な変形性関節症には例えば、(1)荷重関節である膝関節、股関節、足関節、脊椎などにおける変形性膝関節症、変形性股関節症、変形性足関節症、及び変形性脊椎症などの荷重関節における変形性関節症、並びに(2)非荷重関節である肩関節、肘関節、手関節、顎関節などにおける変形性肩関節症、変形性肘関節症、変形性手関節症(例えばヘバーデン結節、ブシャール結節、変形性母指CM関節症など)、顎関節症などの非荷重関節における変形性関節症が含まれる。

【0049】

本発明の実施態様において、変形性関節症は、荷重関節における変形性関節症であり、好ましくは変形性膝関節症及び変形性股関節症である。

【0050】

本発明の別の実施態様において、変形性関節症は、非荷重関節における変形性関節症であり、好ましくは顎関節症である。

【0051】

本発明の治療剤又は予防剤はまた、関節リウマチの治療又は予防にも適応可能である。関節リウマチは、自己免疫疾患であると考えられており、変形性関節症とは病因を異にするが、その病状の進行に伴って変形性関節症と同様に関節軟骨表面の変性と軟骨の破壊が起こる。このため、本発明の治療剤を投与することによって、関節炎症を抑制又は軽減することができる。

【0052】

本明細書中で使用する「治療」、「治療方法」、「治療剤」なる用語は、本発明に係る関節炎症をもつ患者の症状を除去、抑制又は軽減すること、あるいはそのための方法又は医薬を意味する。また、「予防」、「予防剤」なる用語は、関節炎症を予防すること、あるいはそのための医薬を意味する。

【0053】

本発明においてグアニルシクラーゼB(GC-B)とは、ナトリウム利尿ペプチド受容体B(NPR-B)と同義の用語として使用する。

【0054】

本発明においてGC-B活性とは、グアニルシクラーゼ活性と同義の用語として使用する。本発明において、グアニルシクラーゼB(GC-B)活性化物質又はGC-B活性化物質は、CNPの受容体として知られるGC-Bと結合してこれを活性化するペプチド又は非ペプチド性低分子化合物であり、好ましくはCNPペプチド又はその誘導体である。ここでペプチドは、複数の(L-、D-及び/又は修飾)アミノ酸のアミド結合連鎖からなる物質を指し、この中にはポリペプチド及び蛋白質も包含される。GC-B活性化物質は、例えば、COS-7等の培養細胞株にGC-B受容体を発現させ、培地に候補薬剤を添加し、一定の温度及び一定の時間(例えば37℃、5分後)細胞株を培養したのち、細胞内のcGMP産生量を測定する方法(Science 1991; 252: 120-123)によって同定されうる。すなわち、このようなアッセイ系を使用して細胞内cGMPの産生量を指標としてGC-B活性化物質を同定し、それを本発明に使用することができる。

【0055】

本発明の実施態様において、GC-B活性化物質は、ペプチドでありCNP又はその誘導体である。好ましいCNPは、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来のCNP-22及びCNP-53から選択されるものであり、さらに好ましくは、配列番号1のCNP-22又は配列番号2のCNP-53である。

【0056】

本発明の別の実施態様において、上記誘導体が、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列において1~数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつCNP活性を有するものである。

【0057】

本発明で使用可能なCNPには、ヒトを含む哺乳類由来CNP(CNP-22: Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990; 168: 863-870, 国際公開W091/16342、CNP-53: Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990; 170: 973-979, 特開平4-74198号公報、特開平4-139199号公報、特開平4-121190号公報)、鳥類由来CNP(特開平4-120094号公報)、両生類由来CNP(特開平4-120095号公報)、並びに、特開平6-9688号公報、国際公開W002/074234に開示されるCNP類似体ペプチドのようなCNP誘導体が含まれる。

【0058】

天然由来CNPとして、22及び53アミノ残基からなるCNP-22及びCNP-53が知られており、鳥類及びヒトを含む哺乳類由来の各CNPを比較すると種を超えて配列相同が高いため、本発明においては、鳥類又はヒトを含む哺乳類由来のCNP、好ましくはヒトを含む哺乳類由来のCNP、さらに好ましくはヒト由来のCNPが使用されうる。ヒトCNP-22及びCNP-53のアミノ酸配列は、下記の配列番号1及び配列番号2:

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu
Gly Cys (ヒトCNP-22:配列番号1) ;

Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro
Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu
Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys (ヒトCNP-53:配列番号2)

として示される配列を有しており、いずれも分子内ジスルフィド結合を有し、すなわちヒトCNP-22では6位のシステイン残基と22位のシステイン残基との間で、またヒトCNP-53では37位のシステイン残基と53位のシステイン残基との間でそれぞれ分子内ジスルフィド結合を有し、環状ペプチド構造を形成している。

【0059】

ブタCNP-22及びラットCNP-22は、ヒトCNP-22と同一のアミノ酸配列を有するが、一方、ブタCNP-53及びラットCNP-53では17位及び28位のアミノ酸残基がそれぞれHis及びGlyであるのに対しヒトCNP-53ではそれぞれGln及びAlaであり、2つのアミノ酸が相違する(特開平4-139199号公報、特開平4-121190号公報、特開平4-74198号公報)。さらにまた、ニワトリCNP-22は、9位のアミノ酸残基ValのみがヒトCNP-22と異なる以外は同じ一次構造を有している(特開4-120094号公報)。

【0060】

本発明で使用する上記CNPは、天然からの精製CNP、既知の遺伝子工学的手法で製造された遺伝子組換えCNP、既知の化学合成法(例えばペプチド合成機を用いる固相合成法)で製造されたCNPを含み、好ましくは遺伝子工学的手法で製造されたヒトCNP-22およびヒトCNP-53である。遺伝子工学的手法によるヒトCNPの製造は、例えば、ヒトCNP-22又はCNP-53のDNA配列(特開平4-139199号公報)をプラスミド、ファージなどのベクターに組み込み、大腸菌や酵母などの原核もしくは真核生物宿主細胞に形質転換したのち、適する培地中で発現し、好ましくは細胞外にCNPペプチドを分泌させ、産生したCNPペプチドを回収し精製する各工程を含む。遺伝子組換えの基本的な手法は当業者には公知であり、例えばJ. Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載されている。またベクターとしては、市販のベクターあるいは刊行物記載のベクターが使用できる。

【0061】

本発明で使用するCNP誘導体は、CNP活性を有するとともに、ヒトCNP-22又はCNP-53と同一の2つのシステイン残基間のジスルフィド結合による環状ペプチド構造を有するものであって、上記CNPのフラグメント、上記CNP又はそのフラグメントの構成アミノ酸の少なくとも1つをその他のアミノ酸に置換したペプチド、上記CNPそのもの又はその部分ペプチドの構成アミノ酸の少なくとも1つを欠失したペプチド、及び上記CNPそのもの又はその部分ペプチドの構成アミノ酸に1つ以上のアミノ酸を付加したペプチドを含む。アミノ酸の置換、欠失、付加とは、CNP活性を損なわない限り、部位特異的突然変異誘発法などの周知の方法にてアミノ酸の置換、欠失又は付加できる程度の数のアミノ酸が置換、欠失又は付加されることを意味する。このようなCNP-22又はCNP-53の誘導体は例えば、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したCNP活性を有するものである。

【0062】

本発明においてCNP活性とは、GC-Bに作用してグアニルシクラーゼ活性を上昇させる活性や変形性関節症を含む関節炎症を除去、抑制又は軽減する活性あるいは関節軟骨の増殖を促進させる活性をいう。CNP活性は、細胞のグアニルシクラーゼ活性、たとえば細胞内cGMPの産生量を測定することによること、及び/又は、マウス、ラットなどの関節炎症、変形性関節症もしくは関節リウマチモデル動物に一定期間CNP又はその誘導体を投与したのち、後述の実施例6及び7に記載されるように関節炎症抑制効果又は関節軟骨変性抑制効果の程度を測定すること、によって決定しうる。さらにまた「1～数個」とは、通常1

～10、好ましくは1～5、さらに好ましくは1～3の任意の整数を表す。

【0063】

CN-22類似ペプチドには、例えば特開平6-9688号公報や国際公開W002/074234に記載されるような下記の環状ペプチドが含まれる（なお、配列中の下線はヒトCNP-22からの変異を表す）。

【0064】

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala Met Ser Gly Leu
Gly Cys (配列番号3)

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Gln Ser Gly Leu
Gly Cys (配列番号4)

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Ala Ser Gly Leu
Gly Cys (配列番号5)

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys (配列番号6)

Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly
Leu Gly Cys (配列番号7)

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu
Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr (配列番号8)

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe
Arg Tyr (配列番号9)

Cys Phe Gly Xaa Xbb Xcc Asp Arg Ile Gly Xdd Xee Ser Xff Xgg Gly Cys
（ここで、Xaa=Leu, Ile, Val; Xbb=Lys, Leu, Met; Xcc=Leu, Ile, Ala, Val; Xdd=Ser,
Ala, Gly, Thr, Asn; Xee=Met, Ala, Trp, His, Lys, Ser, Gly; Xff=Gly, Lys, Ala, L
eu; Xgg=Leu, Metである。）（配列番号10）

【0065】

また、CNP-53類似ペプチドには、上記のCNP-22類似ペプチドに対応するアミノ酸の同様の
変異を含む環状ペプチドが含まれる。

【0066】

本発明はさらに、GC-B活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、関節軟骨細胞増殖促進剤を提供する。この発明は、GC-B活性化物質が関節軟骨細胞を増加させる働きがあることに基づく。GC-B活性化物質の具体例は、上記定義のCNP又はその誘導体である。CNPは、好ましくは、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来のCNP-22又はCNP-53であり、さらに好ましくは、配列番号1のCNP-22又は配列番号2のCNP-53である。また、CNP誘導体は、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつCNP活性を有するものを含む。他のGC-B活性化物質は、例えば、COS-7等の培養細胞株にGC-B受容体を発現させ、培地に候補薬剤を添加し、一定の温度及び一定の時間（例えば37℃、5分後）細胞株を培養したのち、細胞内のc GMP産生量を測定する方法(Science 1991; 252: 120-123)によって同定されうる。すなわち、このようなアッセイ系を使用して細胞内c GMPの産生量を指標としてGC-B活性化物質を同定し、それを本発明に使用することができる。

【0067】

本発明はまた、GC-Bを活性化することによって関節炎症を抑制することを特徴とする、

関節炎症の抑制方法を提供する。さらに本発明は、GC-Bを活性化することによって関節軟骨細胞の増殖を促進することを特徴とする、関節軟骨細胞の増殖促進方法を提供する。これらの発明は、GC-B活性化物質によって、言い換えればGC-Bを活性化することによって、上記定義の関節炎症、好ましくは変形性関節症を抑制することができるという知見、また関節軟骨細胞の増殖を促進するという知見に基づく。本発明の実施態様により、GC-Bは、上記定義のCNP又はその誘導体によって活性化されうる。

【0068】

本発明はさらに、GC-Bの活性を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む、関節軟骨細胞増殖促進剤のスクリーニング方法を提供する。GC-Bは、グアニルシクラーゼ活性によりGTPからセカンドメッセンジャーであるcGMPの合成を触媒することが知られているので、GC-Bの活性は、細胞内cGMP産生量として測定されうる。

【0069】

本発明の実施態様において、上記スクリーニング方法は、GC-Bを発現する細胞や関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞のグアニルシクラーゼ活性、たとえば細胞内cGMPの産生量を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることからなる工程を含むことができる。

【0070】

本発明の実施態様においてより好ましくは、GC-Bを強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を候補薬剤の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内cGMPの産生量を測定し、候補薬剤の存在下と非存在化での細胞内cGMP産生量の差を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む。

【0071】

本発明のスクリーニング方法は、例えば、COS-7等の培養細胞株にGC-Bを発現させ、培地に候補薬剤を添加し、一定の温度及び一定の時間(例えば37℃、5分後)細胞株を培養したのち、細胞内のcGMP産生量を測定する方法(Science 1991; 252: 120-123)によって関節軟骨細胞増殖促進剤をスクリーニングすることができる。

【0072】

本発明はさらに、GC-Bの活性を指標として、変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤のスクリーニング方法を提供する。上記と同様に、GC-Bの活性は、グアニルシクラーゼ活性、たとえば細胞内cGMP産生量として測定されうる。

【0073】

本発明の実施態様において、上記スクリーニング方法は、GC-Bを発現する培養細胞や関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞のグアニルシクラーゼ活性、たとえば細胞内cGMPの産生量を指標として変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることからなる方法を含むことができる。

【0074】

本発明の実施態様においてより好ましくは、GC-Bを強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を候補薬剤の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内cGMPの産生量を測定し、候補薬剤の存在下と非存在化での細胞内cGMP産生量の差を指標として変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む。

【0075】

本発明のスクリーニング方法は、例えば、COS-7等の培養細胞株にGC-Bを発現させ、培地に候補薬剤を添加し、一定の温度及び一定の時間(例えば37℃、5分後)細胞株を培養したのち、細胞内のcGMP産生量を測定する方法(Science 1991; 252: 120-123)によって変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤をスクリーニングすることができる。

【0076】

本発明の変形性関節症等の関節炎症の治療剤又は予防剤は、有効成分としての上記定義のGC-B活性化物質を、製薬上許容可能な担体、賦形剤、添加剤などと組み合わせて、経口投与用又は非経口投与用に製剤化される。

製剤用の担体や賦形剤としては、例えば、乳糖、ステアリン酸マグネシウム、デンプン、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアゴム、オリーブ油、ゴマ油、カカオバター、エチレングリコールなどやその他常用されるものをあげることができる。

【0077】

経口投与のための固体組成物としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤などが用いられる。このような固体組成物においては、少なくともひとつの有効成分が少なくともひとつの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶性セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は、常法にしたがって不活性な希釈剤以外の添加物、例えば、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、繊維素グリコール酸カルシウムのような崩壊剤、グルタミン酸又はアスパラギン酸のような溶解補助剤を含んでもよい。錠剤又は丸剤は、必要によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートなどの糖衣や胃溶性又は腸溶性物質のフィルムで被覆してもよいし、2つ以上の層で被覆してもよい。さらに、ゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも含まれる。

【0078】

経口投与のための液体組成物は、薬剂的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤などを含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールなどを含んでもよい。この組成物は、不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤などを含んでもよい。

【0079】

非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤が含まれる。水性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば、注射用水及び注射用生理食塩液が含まれる。非水性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80（登録商標）などが含まれる。このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えば、乳糖）、溶解補助剤（例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸）のような補助剤を含んでもよい。これらは、例えば、精密ろ過膜によるろ過滅菌、高圧蒸気滅菌のような加熱滅菌、あるいは、殺菌剤の配合などの通常の滅菌方法によって無菌化することが可能である。注射剤は溶液製剤であっても、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥のための賦形剤としては例えばマンニトール、ブドウ糖などの糖アルコールや糖類を使用することができる。

【0080】

本発明の治療剤又は予防剤は、医薬に一般に使用されている経口投与方法又は非経口投与方法のいずれかによって投与される。好ましくは非経口投与方法、例えば注射による投与（皮下注射、静脈注射、筋肉注射、腹腔内への注射などによる投与）、経皮投与、経粘膜投与（経鼻投与、経直腸投与など）、経肺投与などであるが、経口投与方法による投与も可能である。

【0081】

本発明の製剤中に含まれる有効成分であるGC-B活性化物質、好ましくは上記定義のCNP又はその誘導体、の量は、治療すべき疾患の種類、疾患の重症度、患者の年齢などに応じて決定できるが、一般に $0.005\mu\text{g/kg}\sim 100\text{mg/kg}$ の範囲で投与することができるが、 $0.02\mu\text{g/kg}\sim 5\text{mg/kg}$ で投与することが好ましい。さらに $0.02\mu\text{g/kg}\sim 0.25\text{mg/kg}$ での投与が好ましい。しかしながら本発明のCNPを含有する薬剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

【0082】

本発明の治療剤又は予防剤は、抗炎症薬、ヒアルロン酸や副腎皮質ステロイドなどの従

来の治療剤と組み合わせたり、また関節鏡視下手術、人工関節置換や骨切り術などの整形外科手術と組み合わせ使用することができる。

【0083】

本発明として以下の事項を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

(1) グアニルシクラーゼB (GC-B) 活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、関節炎症の治療剤又は予防剤。

(2) 上記関節炎症が変形性関節症である、上記(1)に記載の治療剤又は予防剤。

(3) 上記変形性関節症が荷重関節の変形性関節症又は非荷重関節の変形性関節症である、上記(2)に記載の治療剤又は予防剤。

【0084】

(4) 上記変形性関節症が変形性膝関節症である、上記(3)に記載の治療剤又は予防剤。

(5) 上記変形性関節症が変形性股関節症である、上記(3)に記載の治療剤又は予防剤。

(6) 上記変形性関節症が顎関節症である、上記(3)に記載の治療剤又は予防剤。

(7) 上記関節炎症が関節リウマチに起因する、上記(1)に記載の治療剤又は予防剤。

(8) 上記関節炎症が変形性関節症に起因する、上記(1)に記載の治療剤又は予防剤。

(9) 上記GC-B活性化物質が、C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) 又はその誘導体である、上記(1)～(8)のいずれかに記載の治療剤又は予防剤。

【0085】

(10) 上記CNPが、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来のCNP-22及びCNP-53から選択される、上記(9)に記載の治療剤又は予防剤。

(11) 上記CNPが、配列番号1のCNP-22又は配列番号2のCNP-53である、上記(9)に記載の治療剤又は予防剤。

(12) 上記誘導体が、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつCNP活性を有するものである、上記(9)に記載の治療剤又は予防剤。

【0086】

(13) GC-B活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、関節軟骨細胞増殖促進剤。

(14) 上記GC-Bが、CNP又はその誘導体である、上記(13)に記載の増殖促進剤。

(15) 上記CNPが、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来のCNP-22又はCNP-53である、上記(14)に記載の増殖促進剤。

(16) 上記CNPが、配列番号1のCNP-22又は配列番号2のCNP-53である、上記(14)に記載の増殖促進剤。

(17) 上記誘導体が、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつCNP活性を有するものである、上記(14)に記載の増殖促進剤。

【0087】

(18) GC-Bを活性化することによって関節炎症を抑制することを特徴とする、関節炎症の抑制方法。

(19) 上記GC-Bが、CNP又はその誘導体によって活性化される、上記(18)に記載の抑制方法。

(20) 上記CNPが、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来のCNP-22又はCNP-53である、上記(19)に記載の抑制方法。

(21) 上記CNPが、配列番号1のCNP-22又は配列番号2のCNP-53である、上記(19)に記載の抑制方法。

(22) 上記誘導体が、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつCNP活性を有するものである、上記(19)に記載の抑制方法。

(23) GC-Bを活性化することによって関節軟骨細胞の増殖を促進することを特徴とする、関節軟骨細胞の増殖促進方法。

【0088】

(24) 上記GC-Bが、CNP又はその誘導体によって活性化される、上記(23)に記載の増殖促進方法。

(25) 上記CNPが、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来のCNP-22又はCNP-53である、上記(24)に記載の増殖促進方法。

(26) 上記CNPが、配列番号1のCNP-22又は配列番号2のCNP-53である、上記(24)に記載の増殖促進方法。

(27) 上記誘導体が、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつCNP活性を有するものである、上記(24)に記載の増殖促進方法。

【0089】

(28) GC-Bの活性を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む、関節軟骨細胞増殖促進剤のスクリーニング方法。

(29) GC-Bを発現する培養細胞又は関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞のGC-B活性を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む、(28)に記載のスクリーニング方法。

(30) 上記GC-Bの活性が、細胞内cGMP産生量として測定される、上記(28)又は(29)に記載のスクリーニング方法。

(31) GC-Bを強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を候補薬剤の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内cGMPの産生量を測定し、候補薬剤の存在下と非存在化での細胞内cGMP産生量の差を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む、上記(28)～(30)に記載のスクリーニング方法。

(32) GC-Bの活性を指標として、変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤のスクリーニング方法。

【0090】

(33) GC-Bを発現する培養細胞又は関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞のGC-B活性を指標として変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、(32)に記載のスクリーニング方法。

(34) 上記GC-Bの活性が、細胞内cGMP産生量として測定される、上記(32)又は(33)に記載のスクリーニング方法。

(35) GC-Bを強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を候補薬剤の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内cGMPの産生量を測定し、候補薬剤の存在下と非存在化での細胞内cGMP産生量の差を指標として変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、(32)～(34)のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

【0091】

(36) グアニルシクラーゼB (GC-B) 活性化物質を有効成分として含む、変形性関節症の治療剤又は予防剤。

(37) グアニルシクラーゼB (GC-B) 活性化物質を有効成分として含む、関節リウマチの治療剤又は予防剤。

(38) 関節炎症の治療を必要とする患者にGC-B活性化物質を投与することを含む、該関節炎症の治療方法。

(39) 上記GC-B活性化物質がCNP又はその誘導体である、上記(38)に記載の治療方法。

(40) 上記関節炎症が変形性関節症である、上記(38)又は(39)に記載の治療方法。

(41) 上記変形性関節症が荷重関節の変形性関節症又は非荷重関節の変形性関節症である、上記(40)に記載の治療方法。

【0092】

(42) 上記変形性関節症が変形性膝関節症、変形性股関節症又は顎関節症である、上記(41)に記載の治療方法。

- (43) 上記関節炎症が関節リウマチに起因する、上記(38)に記載の治療方法。
- (44) 上記関節炎症が変形性関節症に起因する、上記(38)に記載の治療方法。
- (45) 上記CNPが、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来のCNP-22及びCNP-53から選択される、上記(39)～(44)のいずれかに記載の治療方法。
- (46) 上記CNPが、配列番号1のCNP-22又は配列番号2のCNP-53である、上記(39)～(44)のいずれかに記載の治療方法。
- (47) 上記誘導体が、配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつCNP活性を有するものである、上記(39)～(44)のいずれかに記載の治療方法。

【0093】

以下の実施例によって本発明を更に詳細に説明するが、本発明は、これらの実施例によって制限されないものとする。

【実施例1】

【0094】

CNP トランスジェニックマウス作製用ベクターの構築

図1Aに示すように、pGEM-T easy vector (Promega社製)にマウスCNP cDNA (526 bp; FEBS Lett. 276:209-213, 1990)をサブクローニングさせたものをPst Iで切断し、断端を平滑化してマウスCNP cDNAを調製した。PSG1ベクター(Promega社製; 図1B)をEco RIで切断し断端を平滑化して、図1CのようにマウスCNP cDNAをligationし、SAP-mCNP ベクター(pSG1-CNP)を作製した。

【実施例2】

【0095】

CNP トランスジェニックマウスの作製

インジェクション用DNAフラグメントは、次のようにして調製した。まずCNP遺伝子を挿入したSAP-mCNPベクター(pSG1-CNP; 図1C)を、HindIIIおよびXhoIで処理した後、CNP遺伝子を含む断片(約2.3kb)を切り出した。この断片を、Gel Extraction Kit (QIAGEN)により回収し、3 ng/ μ lになるようにPBS⁻で希釈してインジェクション用DNAフラグメント(図2)とした。

【0096】

DNAフラグメントを注入するマウス前核期卵は、次のようにして回収した。すなわち、まずC57BL/6雌マウス(日本クレア)に5 i.uの妊馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSG)を腹腔内投与、さらに48時間後5 i.uのヒト絨毛ゴナドトロピン(hCG)を腹腔内投与することによって、過排卵処理した。この雌マウスを同系統の雄マウスと交配させた。交配の翌朝、プラグを確認したマウスの卵管を灌流してマウス前核期卵を回収した。

【0097】

インジェクション用DNAフラグメントは、マイクロマニピュレーターを用いて前核期卵へ注入した(ジーンターゲティングの最新技術(羊土社)、190-207、2000)。DNAフラグメントを660個のC57BL/6J胚へ注入し、翌日、2細胞期に発生していた胚561個を、偽妊娠1日目の受容雌の卵管に片側当たり10個前後(1匹あたり20個前後)を移植した。

【0098】

分娩予定日に至っても産仔を娩出しなかった受容雌については、帝王切開を施し里親に哺育させた。136例の産仔が得られ、そのうちの5例がCNP遺伝子が導入されたトランスジェニックマウスであった。以下、最初に得られたマウスをFounderと記載する。

【0099】

Founderは全て雄マウスで、これら5ラインのうち4ラインから、次世代(F1マウス)の産仔が得られた。

【実施例3】

【0100】

CNPトランスジェニックマウスの遺伝子型解析

遺伝子型解析は下記に示す手順に従ってサザンブロット法によって行った。

3週齢になったマウスの尾（約15mm）を採取してproteinase K処理（55℃、100 rpmで1昼夜振盪）して溶解液を得た。この溶解液を核酸自動分離装置（KURABO NA-1000）にかけてゲノムDNAを調製した。ゲノムDNA15 μgをPvu II（200 U）で処理してからフェノール・クロロホルム処理によって制限酵素を除いた後にエタノール沈殿でDNAを回収した。回収されたDNAを25 μLのTEに溶解して0.7%アガロースゲル電気泳動（50V定電圧）にかけ、泳動終了後、ゲルを0.25 M HCl溶液で15分間処理してDNAを切断し、水洗してから0.4 M NaOH溶液でナイロンメンブレンに一晩ブロッティングした。その後、メンブレン上のDNAをUVクロスリンク法で固定した。メンブレンをハイブリダイゼーション溶液（50% Formamide、0.5 x Denhardt's、0.5% SDS、5x SSPE）で処理（42℃、2時間）してから、CNPのcDNA（約0.5kb）を鋳型としてBcaBEST Labeling Kit（TaKaRa）で調製した³²P標識プローブを加えて42℃で一晩ハイブリダイゼーションした。その後、洗浄溶液（2 x SSC、0.1% SDS）で55℃、20分間処理してからImaging Plate（Fuji Film）に一晩露光し、導入遺伝子のシグナルをBAS2000（Fuji Film）で検出した（図3）。野生型マウス（WT）では3本のシグナル（wild CNP gene）が検出され、トランスジェニックマウスではwild CNP geneに加えて、導入遺伝子由来のシグナル（transgene）が2本検出された。

【実施例4】

【0101】

CNPトランスジェニックマウスにおけるCNPの発現

CNP濃度の測定には、CNP-22 EIA測定キット（PHOENIX PHARMACEUTICALS INC.社製）を用いた。

【0102】

7週齢の雌雄CNP トランスジェニックマウスおよび雌雄の正常同腹マウス各3例をエーテル麻酔下で後大静脈から全採血して安楽死させた。

【0103】

導入した遺伝子の高発現が予想される臓器である肝臓を採取し、肝重量0.1 gに対して、上記測定キットのEIA assay バッファー1 mLを加え氷冷した。ワーリングブレンダー（ヒスコトロン社製）でホモジナイズし、遠心分離（2,000 rpm、5分間）した上清をCNP-22濃度測定サンプルとした。

【0104】

採取した血液に、1 mgのエチレンジアミン4酢酸・4ナトリウム塩（純正化学社製）と2トリプシン阻害単位のアプロチニン（Sigma社製）を添加して攪拌して血漿を分離し、CNP-22濃度測定サンプルとした。

測定結果を表1に示した。

【0105】

【表1】

表1 CNPトランスジェニックマウスにおけるCNPの発現

		Liver (ng/g tissue)	mean±SD	Plasma (ng/mL)	mean±SD
Wild type	No.1	38.8	29.3±20.5	0.3	0.3±0.06
	No.2	5.9		0.4	
	No.3	43.3		0.3	
CNP tgm	No.1	293.3	290±81.7**	10.3	8.0±4.7#
	No.2	370.0		11.1	
	No.3	206.7		2.6	

**： p<0.01 (対応のないStudent t-test)
#： p<0.05 (Wilcoxon 順位和検定)

【0106】

CNPトランスジェニックマウス (CNP tgm) は野生型 (Wild type) に対する平均値±標準偏差 (mean ± SD) の比較では肝臓 (Liver) で約 10 倍、血漿 (Plasma) で約 24 倍の CNP-22 濃度を示しており、いずれも統計学的に有意な差であった。これらの結果より、CNPトランスジェニックマウスにおいて、CNPペプチドが過剰発現されていることが確認された。

【実施例 5】

【0107】

CNPトランスジェニックマウス関節軟骨の組織学的解析

関節軟骨の厚さおよび軟骨細胞数を組織学的に解析する目的で、9 週齢の CNPトランスジェニックマウスおよび同腹の正常マウスの雌各 5 例、計 10 例をエーテル麻酔下で後大静脈から全採血して安楽死させ、大腿骨を 20% ホルマリンにより 1 週間固定した。その後 20% EDTA-4Na (純正化学社製) 水溶液 (pH7.4) に浸漬して脱灰した後、大腿骨膝蓋面を正中矢状断して常法に従いパラフィン包埋し、パラフィンブロックを作製した。厚さ 4 mm の切片をミクロトームを用いて薄切してパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。関節軟骨の厚さは、対物レンズ 10 倍での 1 視野を画像解析ソフト (IPAP, 住化テクノサービス社製) に取り込み、同ソフトを用いて視野中の 5 点について長さを計測して平均値を算出し、その個体の関節軟骨の厚さとした。この計測に用いた同一の視野について、軟骨細胞数を計測した。これら項目について、同性の正常マウスと CNPトランスジェニックマウスの間で平均値および標準偏差を算出し (Microsoft Excel2000, マイクロソフト社製)、対応のない Student の t 検定によって統計学的解析を行った (SAS ver. 6.12, SASインスティテュートジャパン社製)。

【0108】

関節軟骨の厚さは、雌雄ともに CNPトランスジェニックマウスにおいて統計学的に有意に厚いことが判明した (図 4)。また、1 視野あたりの関節軟骨細胞数も雌雄ともに CNPトランスジェニックマウスにおいて統計学的に有意に多いことが判明した (図 5)。

【0109】

これらの結果から、CNPなどの GC-B (NPR-B) を活性化する物質が、公知である個々の軟骨細胞の肥大化 [J Biol Chem 2003;278(21):18824-32] による細胞容積の増加でなく、軟骨細胞数の増加を伴って関節軟骨の厚さを増加させることが明らかになった。

【実施例 6】

【0110】

CNPトランスジェニックマウスの変形性関節炎モデルに対する抵抗性

膝関節内へのコラゲナーゼ注射により膝関節の靱帯および半月板を不安定化させ変形性関節症を惹起する変形性関節炎動物モデル [Am J Pathol 1989;135:1001-14] を作成した。CNPの変形性関節炎に対する予防及び治療効果を確認する目的で、CNPトランスジェニックマウスを用いた変形性関節炎動物モデルの関節炎症および関節軟骨変性に対する抵抗性を評価した。CNPトランスジェニックマウスおよび同腹の野生型 C57BL/6 系マウスの右膝関節内に 6 マイクロリットルの 3% タイプ II コラゲナーゼ (Sigma 社製) 生理食塩溶液を 2 回投与 (投与開始当日と投与開始後 7 日) した。左右の膝関節幅をノギス (ミットヨ社製) を用いて投与後 28 日まで経時的に測定し、左右の差を算出して膝関節腫脹を表す値とした。その経時的推移曲線下面積 (AUC) を台形法により算出し、CNPトランスジェニックマウスと野生型マウスの間で Student t 検定で比較した。その結果、CNPトランスジェニックマウスにおける AUC は野生型よりも有意に小さく、CNPトランスジェニックマウスがコラゲナーゼによる膝関節腫脹に抵抗性であることが判明した (図 6)。関節炎症および関節軟骨変性を病理組織学的に評価するため、コラゲナーゼ投与後 28 日にエーテル麻酔下に全採血による安楽死後に膝関節を採取し、実施例 5 に記載した方法でヘマトキシリン・エオジン染色標本およびサフラニン O 染色標本を作成し、組織学的に解析した。その結果、野生型マウスではコラゲナーゼにより滑膜における滑膜細胞増勢、肉芽組織形成、炎症性細胞浸潤が顕著であったのに対し、CNPトランスジェニックマウスではこれら変化が著しく弱かった (図 7)。関節軟骨変性については、野生型マウスではサフラニン O 染色性が低

下し、関節軟骨中のプロテオグリカン含量が低下したのに対し、CNPトランスジェニックマウスではその変化は軽微であり、CNPトランスジェニックマウスはコラゲナーゼ投与による関節軟骨変性に抵抗性であることが病理組織学的に示された(図8)。このとき、血漿中CNP濃度をEIAキット(Phoenix Pharmaceutical社製)を用いて測定したところ、野生型マウスの平均値は0.21 ng/mLであったのに対し、CNPトランスジェニックマウスでは0.50 ng/mLであった。

【0111】

これらの結果から、CNPの変形性関節症における関節炎症抑制作用と関節軟骨変性抑制作用を有することが判明した。

【実施例7】

【0112】

インフュージョン投与したCNPの変形性関節炎モデルに対する治療効果(1)

9週齢のC57BL/6 J系の雄マウスの背部皮下に、以下の溶液を含むオスモティックポンプ(2004型、Durect社製)を移植した。

- ・溶媒：5% デキストロース(純正化学社製)、10% マンノース(ナカライテスク社製)および5 mmol/L 塩酸(和光純薬社製)を含有する蒸留水。
- ・CNP-22 (Calbiochem Novabiochem社製) 10 mg/mL 溶液 (60 ng/日)。
- ・CNP-22 (Calbiochem Novabiochem社製) 100 mg/mL 溶液 (600 ng/日)。

【0113】

移植後6日に1.5% タイプIIコラゲナーゼ(Sigma社製)溶液6 mLを右膝関節内に投与し、6日後まで膝左右の膝関節幅をノギス(ミットヨ社製)を用いて投与後28日まで経時的に測定し、左右の差を算出した。この差を膝関節腫脹を表す値とし、そのAUCを溶媒対照群とCNP投与群の間でStudent t検定で比較した(SAS ver. 6.12)。その結果、CNP-22投与群のAUCはいずれの用量とも溶媒対照群に対し有意に小さかった。また、実施例5に記載した方法でヘマトキシリン・エオジン染色標本およびサフラニンO染色標本を作成し、病理組織学的に解析した。

【0114】

その結果、溶媒対照群ではコラゲナーゼにより滑膜における滑膜細胞増勢、肉芽組織形成、炎症性細胞浸潤が顕著であったのに対し、CNP投与群ではこれら変化が著しく弱いことが判明した(図9)。滑膜組織膝関節のこの結果から、CNPが変形性関節症 に対して治療効果を有することが判明した。

【実施例8】

【0115】

インフュージョン投与したCNPの変形性関節炎モデルに対する治療効果(2)

9週齢のC57BL/6 J系の雄マウス(日本クレア社製)の背部皮下に、以下の溶液を含むオスモティックポンプ(2004型、Durect社製)を移植した。

- ・溶媒：5% デキストロース(純正化学社製)、10% マンノース(ナカライテスク社製)および5 mmol/L 塩酸(和光純薬社製)を含有する蒸留水。
- ・CNP-22 (Calbiochem Novabiochem社製) 10 mg/mL 溶液 (60 ng/日)。
- ・CNP-22 (Calbiochem Novabiochem社製) 100 mg/mL 溶液 (600 ng/日)。

【0116】

移植翌日にマウスをエーテル麻酔し、右膝関節に対して前十字靱帯切断、内側側副靱帯切断および内側半月板全切除の外科処置を施し、変形性関節症を惹起した。左右膝関節幅をノギス(ミットヨ社製)を用いて投与後11日まで経時的に測定し、左右の差を算出した。この差を膝関節腫脹を表す値とし、そのAUCを溶媒対照群とCNP投与群の間でStudent t検定で比較した(SAS前臨床パッケージ、SASインスティテュートジャパン社製)。その結果、CNP-22投与群のAUCはいずれの用量とも溶媒対照群に対し有意に小さかった(図10)。

【0117】

この結果から、CNPが外科処置により惹起される、膝関節への物理的過荷重にもとづく

変形性関節症における関節炎症に対しても抑制作用を有することが明らかになった。

【図面の簡単な説明】

【0118】

【図1】この図は、CNP トランスジェニックマウス作製用ベクターの構築を示す。図1A：pGEM-T Easyベクターに組み込まれたマウスCNPのcDNAをPst Iで切り出し両末端を平滑化した。図1B：pSGIをEco RIで処理して断端を平滑化した。図1C：図1Aで得られたマウスCNPのcDNAを図1Bで得られたpSGIに組み込んだ。

【図2】この図は、インジェクション用DNAフラグメントを示す。図1CのpSGI-CNPから、HindIIIおよびXhoIで処理した後、CNP遺伝子を含む断片(約2.3kb)を切り出し、インジェクション用のフラグメントとした。

【図3】この図は、サザンブロット法による導入遺伝子の存在に関するCNPトランスジェニックマウスの遺伝子型解析結果を示す。野生型マウス(WT)では3本のシグナル(wild CNP gene)が検出され、トランスジェニックマウス(Tgm)で野生型CNP遺伝子(wild CNP gene)に加えて、導入遺伝子由来のシグナル(transgene)が2本検出された。

【図4】この図は、CNP トランスジェニックマウスにおける関節軟骨の肥厚を示す。大腿骨膝蓋面の関節軟骨の厚さについて、正常同腹仔(Wild)とCNPトランスジェニックマウス(CNP tgm)の間で比較した。CNPトランスジェニックマウスは統計学的に有意に関節軟骨が厚いことを示している。*: $p < 0.01$ 、対応のないStudentのt検定。

【図5】この図は、CNP トランスジェニックにおける関節軟骨細胞数の増加を示す。大腿骨膝蓋面の関節軟骨における光学顕微鏡下(対物10倍)1視野あたりの軟骨細胞数について、正常同腹仔(Wild)とCNPトランスジェニックマウス(CNP tgm)の間で比較した。CNPトランスジェニックマウスは統計学的に有意に1視野あたりの軟骨細胞数が多いことを示す。*: $p < 0.05$ 、対応のないStudentのt検定。

【図6】この図は、CNP トランスジェニックマウスのコラゲナーゼ0Aモデルにおける関節腫脹抵抗性を示す。CNPトランスジェニックマウス(Tgm)および野生型マウス(WT)の右膝関節に3% コラゲナーゼ生理食塩液を投与後、左右の膝関節幅を計測し、その左右差を膝関節腫脹の指標として推移(図6A)とその曲線下面積(AUC)(図6B)を評価した。CNPトランスジェニックマウスは右膝関節の腫脹が弱い傾向にあり、AUCは野生型に対して有意に小さかった。*: $p < 0.01$, N.S.: 有意差なし。対応のないStudentのt検定。

【図7】この図は、コラゲナーゼ0Aモデルにおける右膝関節滑膜の組織学的変化を示す。CNPトランスジェニックマウスおよび野生型マウス(wild type)の右膝関節に3% コラゲナーゼ生理食塩液を投与後、28日での右膝関節滑膜の組織像である。野生型マウスに3%コラゲナーゼを投与すると、滑膜上皮細胞の増生、肉芽組織形成および炎症性細胞浸潤が認められた(図7B)。一方、CNP トランスジェニックマウスではこれら所見はきわめて軽微であった(図7C)。図7Aは正常滑膜組織を示す。

【図8】この図は、コラゲナーゼ0Aモデルにおける右大腿骨内顆関節軟骨の組織学的変化を示す。CNPトランスジェニックマウスおよび野生型マウス(wild type)の右膝関節に3% コラゲナーゼ生理食塩液を投与後、28日での右大腿骨内顆関節軟骨の組織像である。野生型マウスでは軟骨基質のサフラニンO染色性が低下し、プロテオグリカン含量低下が認められた(図8B)のに対し、CNP トランスジェニックマウスではサフラニンO染色性は保たれていた(図8C)。図8Aは正常関節軟骨を示す。

【図9】この図は、Infusion投与したCNPのマウスコラゲナーゼ0Aモデルにおける関節腫脹抑制効果を示す。C57BL/6 J Jcl系マウスにCNP-22を皮下に持続投与し、右膝関節に1.5% コラゲナーゼ生理食塩液を投与して6日後に測定した右膝関節腫脹を示す。CNP-22は60, 600 ng/day群ともに溶媒対照群(Vehicle)に対して有意に右膝関節の腫脹を抑制した。対応のないStudentのt検定。

【図10】この図は、Infusion投与したCNPのマウス外科的0Aモデルにおける関節腫

腫抑制効果を示す。C57BL/6 J Jcl系マウスにCNP-22を皮下に持続投与し、右膝関節に前十字靱帯切除、内側副靱帯切除および内側半月板全切除の外科処置を加えて変形性関節症を惹起した。術後4、8、11日後に左右膝関節幅を測定、その差のAUCを示した。CNP-22は60、600 ng/day群ともに溶媒対照群（Vehicle）に対して有意に右膝関節の腫脹を抑制した。対応のないStudentのt検定。

【配列表フリーテキスト】

【0119】

配列番号1の説明：6-Cysと22-Cysの間でジスルフィド結合が形成される。

配列番号2の説明：37-Cysと53-Cysの間でジスルフィド結合が形成される。

配列番号3の人工配列の説明：CNP-22誘導体（ここで、6-Cysと22-Cysの間でジスルフィド結合が形成される）。

配列番号4の人工配列の説明：CNP-22誘導体（ここで、6-Cysと22-Cysの間でジスルフィド結合が形成される）。

配列番号5の人工配列の説明：CNP-22誘導体（ここで、6-Cysと22-Cysの間でジスルフィド結合が形成される）。

配列番号6の人工配列の説明：CNP-22誘導体（ここで、1-Cysと17-Cysの間でジスルフィド結合が形成される）。

配列番号7の人工配列の説明：CNP-22誘導体（ここで、7-Cysと23-Cysの間でジスルフィド結合が形成される）。

配列番号8の人工配列の説明：CNP-22誘導体（ここで、6-Cysと22-Cysの間でジスルフィド結合が形成される）。

配列番号9の人工配列の説明：CNP-22誘導体（ここで、1-Cysと17-Cysの間でジスルフィド結合が形成される）。

配列番号10の人工配列の説明：CNP-22誘導体（ここで、4-Xaa=Leu, Ile, Val; 5-Xaa=Lys, Leu, Met; 6-Xaa=Leu, Ile, Ala, Val; 11-Xaa=Ser, Ala, Gly, Thr, Asn; 12-Xaa=Met, Ala, Trp, His, Lys, Ser, Gly; 14-Xaa=Gly, Lys, Ala, Leu; 15-Xaa=Leu, Met。 また、1-Cysと17-Cysの間でジスルフィド結合が形成される。）。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Nakao, Kazuwa
CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., Ltd.

<120> Agent for treating or preventing arthritis

<130> P04-0213

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Description: A disulfide bond is formed between 6-Cys and 22-Cys

<400> 1

Gly	Leu	Ser	Lys	Gly	Cys	Phe	Gly	Leu	Lys	Leu	Asp	Arg	Ile	Gly	Ser
1				5					10					15	

Met	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys
			20		

<210> 2

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Description: A disulfide bond is formed between 37-Cys and 53-Cys

<400> 2

Asp	Leu	Arg	Val	Asp	Thr	Lys	Ser	Arg	Ala	Ala	Trp	Ala	Arg	Leu	Leu
1				5					10					15	

Gln	Glu	His	Pro	Asn	Ala	Arg	Lys	Tyr	Lys	Gly	Ala	Asn	Lys	Lys	Gly
			20					25					30		

Leu	Ser	Lys	Gly	Cys	Phe	Gly	Leu	Lys	Leu	Asp	Arg	Ile	Gly	Ser	Met
		35					40						45		

Ser Gly Leu Gly Cys
50

<210> 3
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: CNP-22
derivative, where a disulfide bond is formed between 6-Cys and 22-Cys

<400> 3
Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

<210> 4
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: CNP-22
derivative, where a disulfide bond is formed between 6-Cys and 22-Cys

<400> 4
Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15

Gln Ser Gly Leu Gly Cys
20

<210> 5
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: CNP-22
derivative, where a disulfide bond is formed between 6-Cys and 22-Cys

<400> 5

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15

Ala Ser Gly Leu Gly Cys
20

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: CNP-22
derivative, where a disulfide bond is formed between 1-Cys and 17-Cys

<400> 6

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly
1 5 10 15

Cys

<210> 7

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: CNP-22
derivative, where a disulfide bond is formed between 7-Cys and 23-Cys

<400> 7

Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly
1 5 10 15

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys
20

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: CNP-22
derivative, where a disulfide bond is formed between 6-Cys and 22-Cys

<400> 8

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
20 25

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CNP-22
derivative, where a disulfide bond is formed between 1-Cys and 17-Cys

<400> 9

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Gln Ser Gly Leu Gly
1 5 10 15

Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
20

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CNP-22
derivative, where 4-Xaa=Leu, Ile, Val; 5-Xaa=Lys, Leu, Met; 6-Xaa=Leu, Ile
, Ala, Val; 11-Xaa=Ser, Ala, Gly, Thr, Asn; 12-Xaa=Met, Ala, Trp, His, Lys, Ser,
Gly; 14-Xaa=Gly, Lys, Ala, Leu; 15-Xaa=Leu, Met and where a disulfide bond is fo
rmed between 1-Cys and 17-Cys

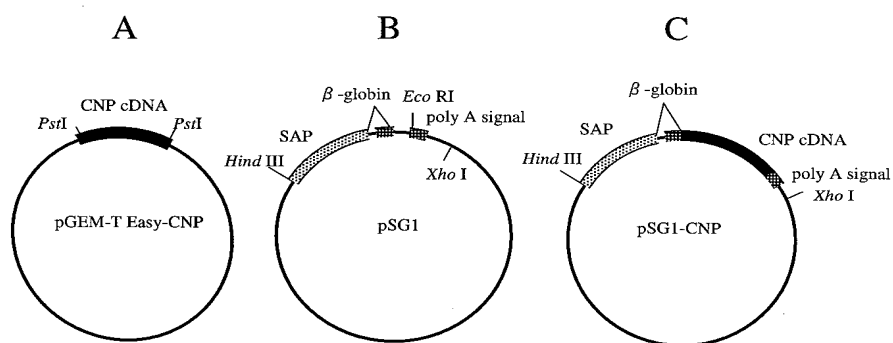
<400> 10

Cys Phe Gly Xaa Xaa Xaa Asp Arg Ile Gly Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Gly
1 5 10 15

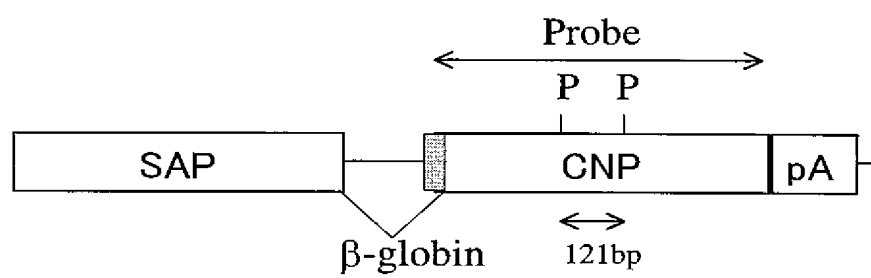
Cys

【書類名】 図面

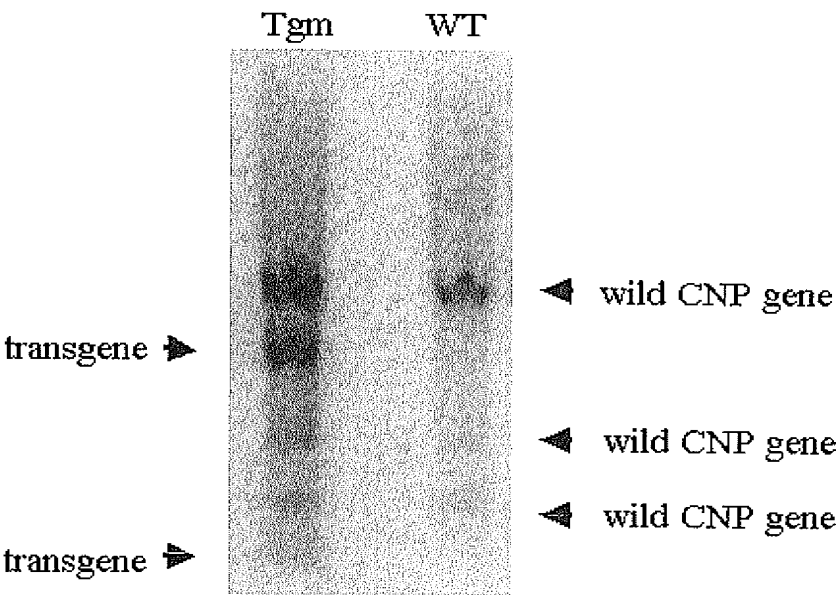
【図 1】



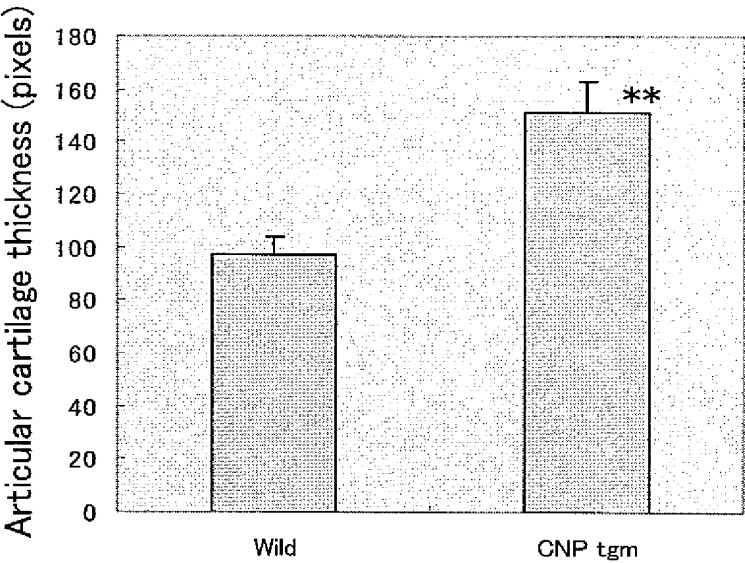
【図 2】

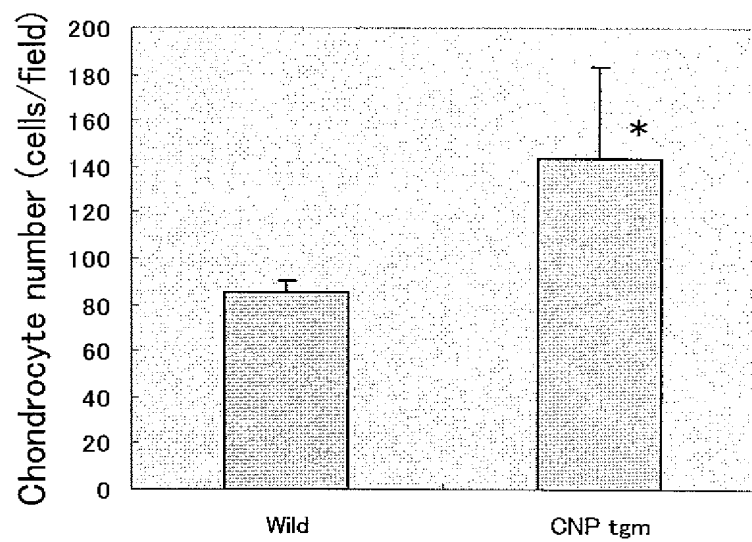


【 図 3 】

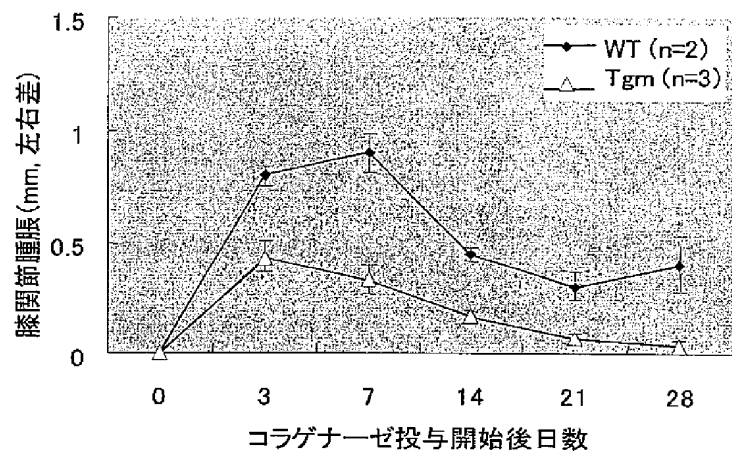


【 図 4 】

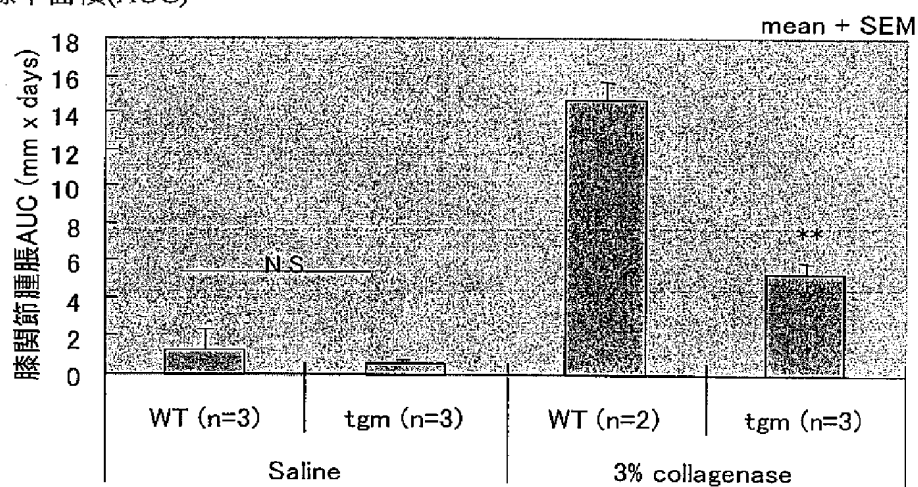




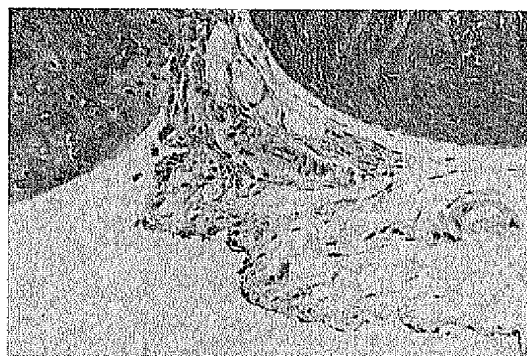
A : 膝関節腫瘍の推移



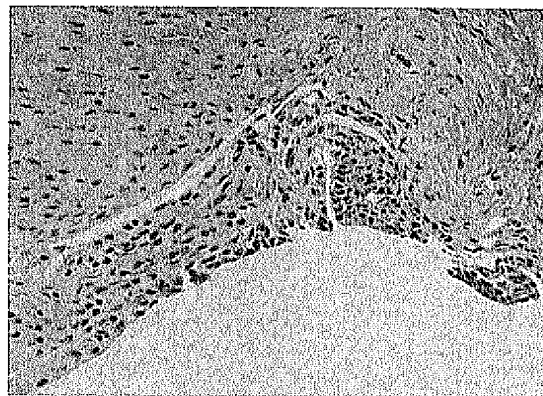
B : パネルAの曲線下面積(AUC)



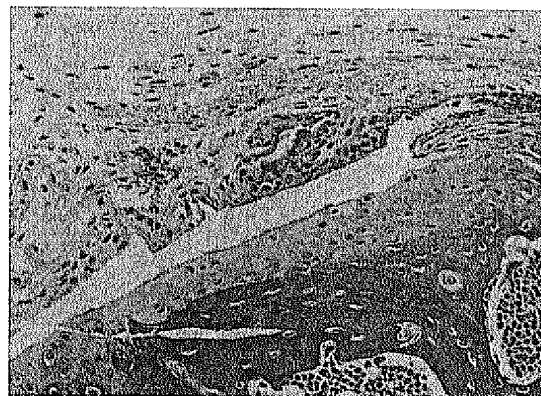
A : 正常滑膜組織



B : 3% コラゲナーゼ投与、wild type



C : 3% コラゲナーゼ投与、CNP トランスジェニックマウス line #17



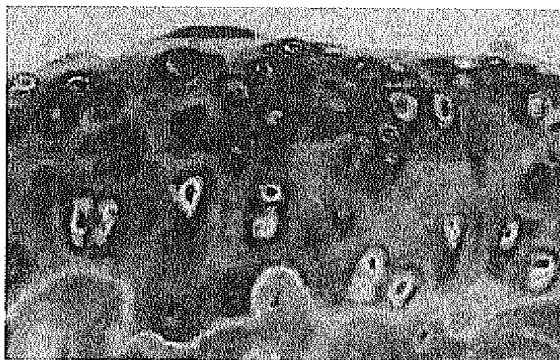
A : 正常関節軟骨



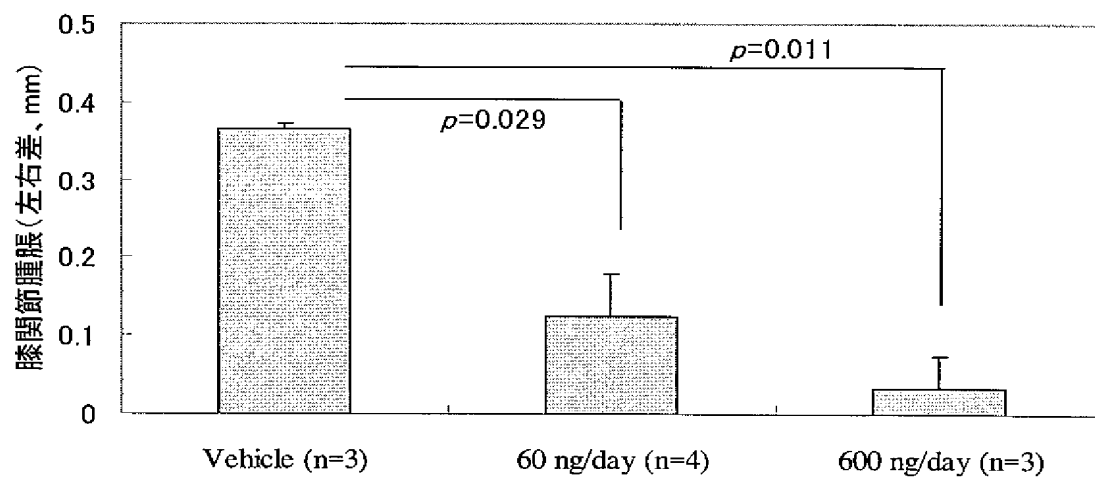
B : 3% コラゲナーゼ投与、wild type



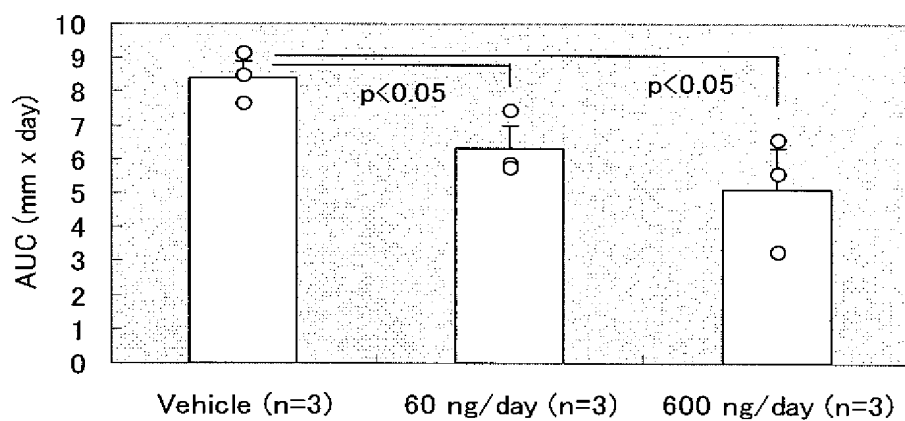
C : 3% コラゲナーゼ投与、CNPトランスジェニックマウス line #17



【図 9】



【図 10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 変形性関節症などの関節炎症に対する新しい治療剤または予防剤を提供すること。

【解決手段】 グアニルシクラーゼB（GC-B）活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、変形性関節炎症などの関節炎症の治療剤、予防剤または関節軟骨細胞増殖促進剤、あるいは、GC-Bを活性化することによる関節炎症の抑制方法又は関節軟骨細胞の増殖促進方法、あるいは、GC-Bの活性を指標とした関節軟骨細胞増殖促進剤又は関節炎症治療剤のスクリーニング方法。

【選択図】 図 9

出願人履歴

5 0 1 3 8 2 3 1 7

20010928

新規登録

京都府京都市西京区大枝北杓掛町4-1-2

中尾 一和

0 0 0 0 0 3 3 1 1

19900905

新規登録

5 9 6 0 5 8 8 8 9

東京都北区浮間5丁目5番1号

中外製薬株式会社